动 物 学 研 究 2009，Apr. 30(2): 178−184 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.02178

人精液凝固蛋白Ⅰ衍生合成肽的抗菌活性

高振华[1,2,#]，赵 晖[1,2,#]，余果宇[1,3]，张 云[1]，申吉泓[2,*]，李文辉[1,*]

(1. 中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室，云南 昆明 650223；2. 昆明医学院第一附属医院 泌尿外科，云南 昆明 650032；3. 昆明医学院 生物化学教研室，云南 昆明 650031)

摘要：SgI-29 是作者最新发现的有抗菌活性的人精液凝固蛋白 I 衍生抗菌肽。以 SgI-29 为模板，合成 4 种不同肽链长度的 SgI-29 衍生小肽，利用理化性质分析软件及螺旋轮作图法对 SgI-29 及其衍生物进行了理化性质及结构的预测，结合琼脂糖弥散法抗菌试验得到的不同合成肽段对大肠杆菌标准菌株(*Escherichia coli* ATCC 25922)以及绿脓杆菌标准株(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)的抗菌活性实验结果，探讨了 SgI-29 及其衍生物的结构-功能关系。结果表明：SgI-22 在所有的 SgI-29 及其衍生物中有最好的抗菌活性，是进行进一步结构优化的良好模板。

关键词：人；精液凝固蛋白 I; 抗菌肽; 抗菌活性
中图分类号：Q39；Q512.8；Q344.13；Q786 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)02-0178-07

Antibacterial Activity Investigation of Human Semenogelin I Derived Peptides

GAO Zhen-hua[1,2,#], ZHAO Hui[1,2,#],YU Guo-yu[1,3], ZHANG Yun[1], SHEN Ji-hong[2,*], LEE Wen-hui[1,*]

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Diseases Mechanisms , Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan* 650223, *China*; 2. *Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming Yunnan* 650032, *China*; 3. *Biochemistry Section of Kunming Medical College, Kunming Yunnan* 650031, *China*)

Abstract: SgI-29 is a newly characterized antibacterial peptide derived from human semenogelin I. Using SgI-29 as model, 4 peptides with different length were synthesized. Physico-chemical characteristics and structure prediction of SgI-29 and its derived peptides were analyzed by software packages and helix-wheel plot. The antibacterial activities of SgI-29 and its derived peptides against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were determined. The structure-function relationship of SgI-29 and its derivatives was analyzed. Our results indicated that SgI-22 has the strongest antibacterial activities against the tested bacteria among the synthetic peptides and might be used as a good model for the structure optimization.

Key words: Human; Semenogelin I; Antibacterial peptide; Antibacterial activity

精液凝固蛋白(semenogelin，Sg)I 以及 II 是男性精液在射出体外后发生凝固的主要物质，SgI 成熟蛋白由 439 个氨基酸残基组成，正常精液凝固后立即发生精液的液化，精液液化过程中会产生出许多的来源于 SgI 前体的降解片段，从精液中分离的不同大小的 SgI 的水解片段具有不同的生物学活性(Bjartell et al, 1996; Bourgeon et al, 2004; Jonsson et al, 2005)。这一过程主要由前列腺来源的丝氨酸蛋白酶－前列腺特异抗原(PSA)，在其他一些前列腺来源的丝氨酸蛋白酶共同作用下得以完成(Robert

收稿日期：2009-01-16；接受日期：2009-02-23
基金项目：国家自然科学基金（30670412）；中国科学院重要方向项目（KSCX2-YW-R-088）；云南省自然科学基金资助项目（2005PY01-23；2007C0006R；2006PT08-1；2006C0047Q）
*通讯作者(Corresponding authors)：申吉泓，Tel: 0871-5324888-2402，E-mail: kmsjh99@yahoo.com.cn；李文辉，Tel: 0871-5194279, E-mail: leewh@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：高振华（1982-），男，硕士研究生。研究方向：泌尿外科及男科学专业；赵晖（1972-），男，医学博士。研究方向：泌尿外科及男科学专业
共同第一作者（Authors contributed equally to the work）

et al, 1997)。近年来，SgI 降解片段具有抗菌活性的研究取得了一定进展(Bourgeon et al, 2004; Edström et al, 2008; Wang et al, 2005; Zhao et al, 2008a, 2008b)。

泌尿生殖道感染是泌尿生殖道的常见多发病，随着抗生素的滥用，出现了越来越多的难治性感染，给患者带来了极大的痛苦和经济负担，寻找新型有效的抗菌药物显得非常有必要。通过离子交换、分子筛以及 HPLC 等层析步骤，我们从健康人精液中分离纯化得到了 4 个天然抗菌肽，并对其性质进行了研究。N-末端氨基酸序列测定以及 FAB 质谱结果揭示，我们分离得到的 4 个抗菌肽衍生自 SgI，它们分别命名为：SgI-29(成熟 SgI 85-113)、SgI-46(成熟 SgI 85-130)、SgI-47(成熟 SgI 85-131) 和 SgI-52(成熟 SgI 85-136)。值得注意的是，SgI-29、SgI-46 以及 SgI-47 是目前为止新发现的精液凝固蛋白 I 衍生产物。抗菌实验结果表明，SgI-29 对大肠杆菌 ATCC 25922 以及大肠杆菌青霉素耐药标准株 ML-35P 均具有较强的抑菌活性，而 SgI-52 在相同实验条件下活性明显偏弱(Zhao et al, 2008a)。由于天然纯化得到的 SgI-52 数量有限，为了获得较大量的 SgI-52，进一步研究 SgI-52 的生物学功能和活性，我们通过原核表达系统对 SgI-52 进行了表达及纯化。测定了重组 SgI-52 对大肠杆菌 ATCC 25922 标准株，以及耐氨苄标准株 ML-35P 的最低抑制浓度 MIC，结果表明：在相同实验条件下，SgI-29 对大肠杆菌 ATCC 25922 标准株，以及耐氨苄标准株 ML-35P 的最低抑制浓度 MIC 值比 SgI-52 分别高出 6.5 倍和 6.2 倍。实验结果揭示，随着 SgI 水解的进行，其抗菌活性逐步增强(Zhao et al, 2008b)。

为探讨新发现的人源性抗菌肽 SgI-29 的结构-功能关系，以 SgI-29 为模板，我们合成了不同长度的 SgI-29 衍生肽，并对它们的抗菌活性进行了研究，期望找到具有更高活性且长度更短的多肽，为进一步的深入研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司(英国)，其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 多肽合成

实验所用多肽由西安联美公司采用常规化学法合成，其氨基酸序列见表 1。所有合成肽的纯度均>95%。合成肽使用无菌去离子水作溶剂配成浓度为 4 mg/mL 的母液，存放于−20℃备用。

1.3 合成肽的理化及结构分析

合成肽的分子质量(mass)、等电点(pI)采用分析软件进行计算(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)。疏水残基在分子中的百分率(hydrophobic ratio%)利用软件进行计算(http://aps.unmc.edu/AP/design/design_action_input.php)。抗菌肽分子的疏水性(hydrophobicity)以及疏水力矩(hydrophobic moment)预测利用抗微生物数据库 2(APD2)进行(http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php)。螺旋轮作图采用软件进行(http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py)。

表 1 合成 SgI-29 及其衍生肽的长度及氨基酸序列

Tab. 1 Length and amino acid sequences of synthetic SgI-29 and its derivatives

名称 Name	长度 Length	氨基酸序列 Amino acid sequences
SgI-29	29	HNKQEGRDHDKSKGHFHRVVIHHKGGKAH
SgI-25	25	KQEGRDHDKSKGHFHRVVIHHKGGK
SgI-22	22	KQEGRDHDKSKGHFHRVVIHHK
SgI-19	19	GRDHDKSKGHFHRVVIHHK
SgI-14	14	KSKGHFHRVVIHHK

1.4 实验菌株

大肠杆菌标准菌株(*Escherichia coli* ATCC 25922) 以及绿脓杆菌标准株(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)由昆明医学院第一附属医院检验科保种。

1.5 抗菌试验

参照文献方法(Lehrer et al, 1991)并进行适当改进(Zhao et al, 2008b)，采用琼脂糖双层打孔法测定最低抑菌浓度 MIC(minimal inhibition concentration)。底层培养基配方为：1%低熔点琼脂糖(Sigma A6013)，0.3 mg/mL胰蛋白胨(Oxoid产品)溶于 10 mmol/L pH 7.4 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4缓冲液中。底层培养基 20 mL于 42℃时分别加入过夜培养对数生长期细菌(终浓度约 10^5－10^6CFU)，摇匀后

使其在直径76 mm培养皿中均匀地摊布作为底层。待凝固后，底层培养基上打3 mm的圆孔，每孔加5 μL不同浓度的抗菌肽水溶液。各孔中抗菌肽的浓度(g/L)分别为: 2000、1000、500、250, 125、62.5、31.25。另设阳性对照为100 g/mL氨苄青霉素，阴性对照为灭菌水。37℃孵育3 h后，在底层上覆盖一层营养琼脂(顶层培养基: 1% Sigma A6013低熔点琼脂糖，0.6 mg/mL Oxoid胰蛋白胨溶于10 mmol/L pH 7.4 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4缓冲液中)，37℃继续孵育12－16 h。测量无菌生长的透明环直径。抗菌活性的计算：抗菌活性单位U＝(抗菌环的直径mm^{-3}) × 10。以抗菌肽浓度的对数值为横坐标，抗菌活性为纵坐标作回归方程，并计算能抑制细菌生长的抗菌肽的最小浓度MIC。此试验重复3次，取平均值。

2 结 果

2.1 SgI-29及其衍生肽的理化性质及结构预测

SgI-29是由正常人精液中分离纯化得到的具有抗菌活性的衍生自精液凝固蛋白I的天然抗菌肽(Zhao et al, 2008a)。SgI-25是在SgI-29的基础上去除了N-末端的二个氨基酸残基(HN)以及C-末端的二个氨基酸残基(AH)；SgI-22是在SgI-25的基础上去掉了C-末端的GGK序列；SgI-19是在SgI-22的基础上去掉了N-末端的KQE序列；SgI-14是在SgI-19基础上去掉了N-末端的GRDHD序列。APD2结构预测表明，SgI-29及其衍生肽均可能形成-螺旋(Wang et al, 2009)。为方便比较，人源性-螺旋抗菌肽LL-37的衍生物RK-31(序列为：RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES)也进行了相同的性质预测。预测结果表明：SgI-29及其衍生肽的等电点pI值变动范围在9.99－11.26，人RK-31的pI为11.04；中性pH值时的静电荷状态是衡量分子与带负电荷的细菌外壁结合能力的一个重要指标，SgI-19以及SgI-22在中性pH值时的静电荷为+3，SgI-29、SgI-25和SgI-14在中性pH值时的静电荷均为+4，RK-31在中性pH值时的静电荷则为+7；疏水氨基酸残基在分子中的百分比在一定程度上反映了分子的疏水性，SgI-29及其衍生肽中疏水氨基酸残基在分子中的百分比范围为16%－28%，RK-31中疏水氨基酸残基在分子中的百分比为29%；疏水性指标中负值表示亲水，正值代表疏水，SgI-29及其衍生肽分子的疏水性变动范围为−0.007－0.181，RK-31的疏水性为0.039；疏水力矩是衡量-螺旋分子两亲性的指标，疏水力矩值H越大，表明分子的两亲性越高(Eisenberg et al, 1982)，SgI-29及其衍生肽分子的疏水力矩变动范围为0.109－0.230，RK-31的疏水力矩为0.538，见表2。

表2 合成肽和人抗菌肽RK-31的物理化学特征比较

Tab. 2 Comparison of physico-chemical characteristics of synthetic peptides and human antibacterial peptide RK-31

肽 Peptides	质量 Mass (Da)	等电点pI	净电荷 Net charge	疏水残基百分率 Hydrophobic Ratio(%)	疏水性 Hydrophobicity (H)	疏水力矩 Hydrophobic moment (μH)
SgI-29	3377.74	10.17	+4	17	-0.095	0.109
SgI-25	2918.28	10.17	+4	16	-0.109	0.149
SgI-22	2676.00	9.99	+3	18	-0.007	0.211
SgI-19	2290.58	10.28	+3	21	0.006	0.230
SgI-14	1710.02	11.26	+4	28	0.181	0.213
RK-31	3800.51	11.04	+7	29	0.039	0.538

2.2 SgI-29及其衍生肽以及RK-31的螺旋轮作图分析

螺旋轮作图揭示人源性-螺旋广谱抗菌肽LL-37的衍生物RK-31具有典型的抗菌肽结构特征，RK-31分子的碱性氨基酸残基除第4位赖氨酸(K)外，均位于分子的一个侧面，而对分子的疏水性起重要贡献的强疏水性氨基酸残基苯丙氨酸(F)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)则分布于分子的另一端，由此形成了RK-31分子较好的两亲性结构。螺旋轮作图提示RK-31的疏水性表面主要由I^{14}、I^{7}、L^{25}、I^{18}四个强疏水性氨基酸残基所组成，图中箭头的长短显示了疏水力矩的高低(图1，RK-31)。与人广谱抗菌肽RK-31比较，SgI-29及其衍生肽的螺旋轮作图显示它们的两亲性结构特征不显著，具体表现在SgI-29及其衍生肽都没有多个疏水性氨基酸残基所形成的疏水性表面。SgI-29尽管含有较多的疏水性氨基酸残基，然而弱疏水性氨基酸丙氨酸(A)以及甘氨酸(G)所占比例太高，分子中仅有的4个强疏水性氨基酸中，I^{21}又位于碱性氨基酸所形成的分子带正电荷一侧，削弱了分子整体的疏水性，造成

了分子的疏水力矩在所有分子中是最低的(图 1，SgI-29)。SgI-25 是在SgI-29 的基础上去除了N-末端的二个氨基酸残基(HN)以及C-末端的二个氨基酸残基(AH)所形成，螺旋轮作图揭示去除了N-末端的二个氨基酸残基HN后，在SgI-29 中位于分子外侧的二个强疏水性氨基酸残基(V^{19}、V^{20})在SgI-25 分子中由于缺乏HN的支撑，相对应的二个强疏水性氨基酸残基(V^{17}、V^{18})在SgI-25 分子表面的暴露程度不及SgI-29 的V^{19}、V^{20}，造成其分子的疏水性在所有分子中是最低的。而C-末端的二个氨基酸残基AH的去除引起SgI-25 酸性氨基酸残基D^8以及碱性氨基酸残基K^9的暴露(图 1，SgI-25)。SgI-22 是在SgI-25 的基础上去掉了C-末端的$G^{23}G^{24}K^{25}$序列，K^{25}的去除有利于SgI-22 疏水区域的形成。$G^{23}G^{24}$序列的去除引起SgI-22 二个带不同电荷R^5及D^6的暴露，再加上SgI-25 中K^{25}的去除，使得SgI-22 整个分子的pI值下降，是所有列入比较的肽当中pI值最低的(图 1，SgI-22)。SgI-19 是在 SgI-22 的基础上去掉了N-末端的KQE序列，螺旋轮结构预测显示SgI-19 的带正电荷区域变得不连续，而疏水区域由于去除了酸性氨基酸残基E而使得分子的疏水性有所加强，SgI-19 分子的两亲性在SgI-29 及其衍生肽中是最强的(图 1，SgI-19)。SgI-14 是在SgI-19 基础上去掉了N-末端的GRDHD序列，SgI-14 分子不含酸性氨基酸残基，但由于分子中氨基酸残基$G^4I^{11}H^7$的排阻效应，使得分子的二个带正电荷区域相隔较远，不利于分子正电荷区域的集中，分子中较多的组氨酸残基(H)对其性质有较大影响(图 1，SgI-14)。

2.3　合成 SgI-29 及其衍生物的最低抑菌浓度测定

琼脂糖弥散抑菌实验测试结果表明：合成SgI-29 及其衍生物对大肠杆菌 *E. coli*(ATCC 25922)的最低抑菌浓度值由强到弱依次为：SgI-22>SgI-29>SgI-19>SgI-14>SgI-25，而合成 SgI-29 及其衍生物对绿脓杆菌 *P. aeruginosa*(ATCC 27853)的最低抑菌浓度值由强到弱依次为：SgI-22>SgI-19>SgI-14>SgI-29>SgI-25，见表 3。

表 3　合成 SgI-29 及其衍生物的最低抑菌浓度测定结果
Tab. 3　MIC value determination of synthetic SgI-29 and its derivatives

菌株 Bacteria strains	最低抑菌浓度 Minimal inhibition concentration (MIC)*(μmol/L)				
	SgI-14	SgI-19	SgI-22	SgI-25	SgI-29
Escherichia coli ATCC 25922	1.28	1.24	0.69	1.37	0.99
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	1.51	0.554	0.38	2.09	2.07

数据为 3 次独立重复实验的平均值；*抑制细菌生长的抗菌肽的最小浓度。
The data represents mean values of three independent experiments performed in duplicates; *Minimal inhibition concentrations (MIC) of antibacterial peptides to inhibit bacterial growth.

3　讨　论

新结构抗菌肽发现后，以该结构为模板进行结构−功能研究是深入探讨抗菌肽与细菌相互作用的重要步骤。以人源性抗菌肽 LL-37 的研究为例，最初的研究伴随人 Cathelicidin cDNA 结构的解析而得到，当时推测的加工位点为双碱基 KR↓，产生命名为 FALL-39 的成熟肽(Agerberth et al, 1995)。随后的研究证明天然纯化的人 Cathelicidin 家族的抗菌肽的切点为 FA↓，产生天然 LL-37 抗菌肽。人源性抗菌肽 LL-37 分子在体外显示了优良的抗菌活性，但由于它在生理溶液血浆、血清、淋巴液、组织液等存在的条件下，其抗菌活性会大大降低甚至消失，同时 LL-37 分子具有较强的细胞毒性，使得它不能用于对全身性细菌感染的治疗。进一步研究表明 LL-37 N-末端的疏水性氨基酸对其细胞毒活性有较大贡献，去除 N-末端 6 个氨基酸的 LL-37 衍生物——RK-31 与 LL-37 的比较研究证明：RK-31 的抗菌活性在 NaCl 存在的情况下高于 LL-37；RK-31 与 LL-37 对 LPS 的中和作用相同。在 60mol/L 的浓度下，RK-31 对人红细胞的溶血活性仅为 LL-37 溶血活性的 4%；20 mol/L 的浓度下作用 16h 后，RK-31 无细胞毒性，而 LL-37 显示了较高的细胞毒性；0.01—10 mol/L 的情况下，RK-30 与 LL-37 对颗粒细胞的趋化作用无差异，同时，RK-31(20mol/L)在 100%血清存在下，其抗菌活性仍得到较好的保持，LL-37 则丧失活性。这些结果大大促进了以 LL-37 衍生物为基础的，应用于临床治疗细菌性感染疾病的药物

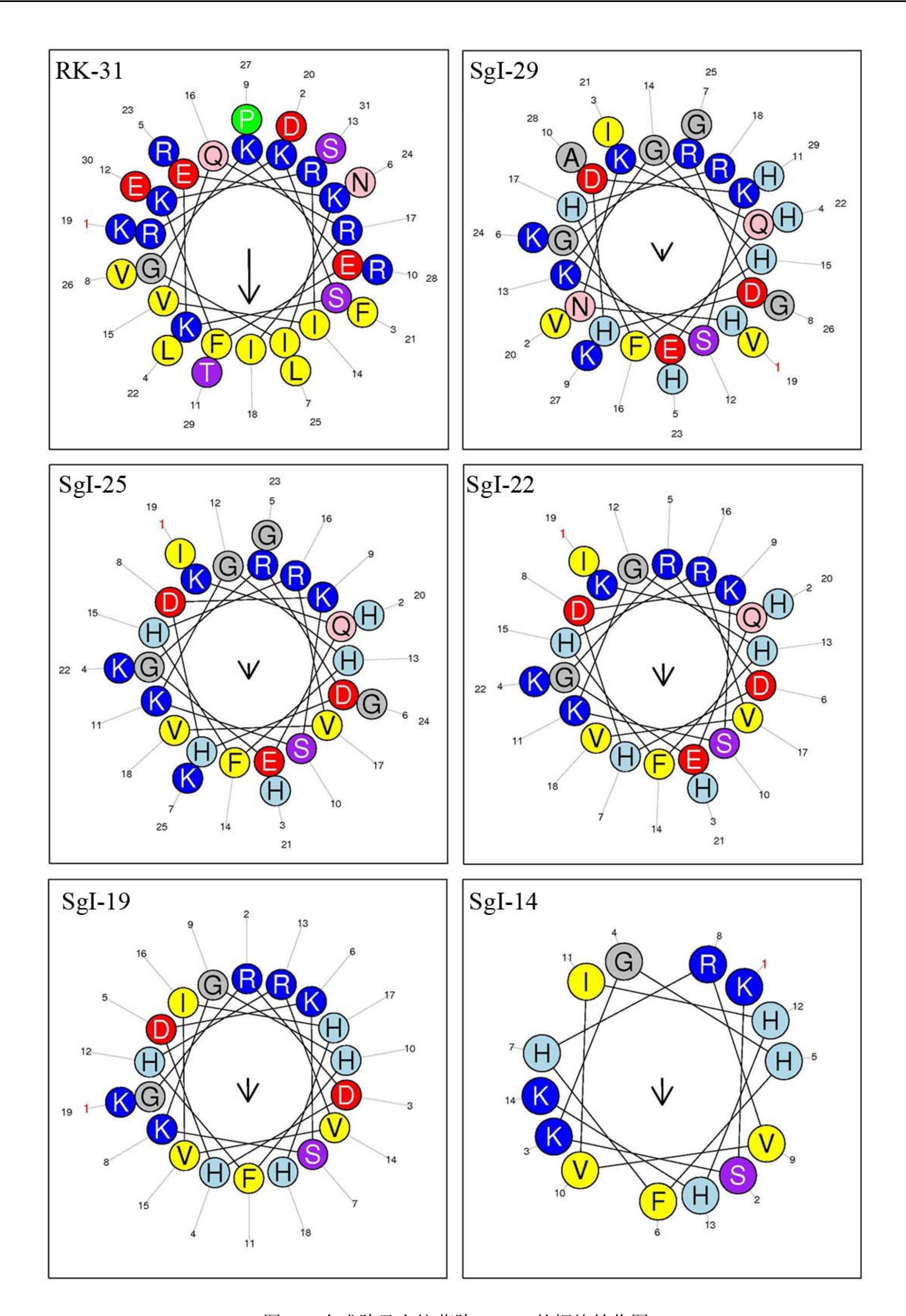


图 1 合成肽及人抗菌肽 RK-31 的螺旋轮作图
Fig. 1 Helix-wheel plot of synthetic peptides and human antibacterial peptide RK-31

的研发(Ciornei et al, 2005)。令人惊喜的是，通过不同的翻译后加工，人体皮肤本身也能产生天然的、与 RK-31 完全相同的天然抗菌肽(Murakami et al, 2004)。最新的研究结果表明，对应于 LL-37 第 18—29 位氨基酸残基所组成的片段 KR-12(KRIVQRIKDFLR)是 LL-37 中最小的具有抗菌活性的片段(Wang, 2008)。

精液的主要作用是为女性生殖道中的精子提供营养和保护，而这其中的保护作用对于生殖来说是至关重要的。最新的研究结果揭示：刚排出体外的精液无抗菌活性，精液的抗菌活性随时间呈现从无到有而后又消失的变化，这一过程伴随着 SgI 分子的逐步降解。随着精液凝固蛋白 SgI 和 SgII 的降解为越来越小的片段，它的抗菌活性亦逐渐丧失，很有可能是因为过强的精浆抗菌效应会扰乱阴道正常的菌群，由此推测精浆中 SgI 降解片段所产生短暂的抗菌活性一方面可以保护精子；另一方面又防止阴道因为长时间受到有抗菌活性 SgI 降解片段的影响而导致正常菌群的失调。尽管精液中也含有分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(SLPI)以及乳铁蛋白(lactoferrin)等具有抗菌活性的蛋白质，然而它们对精液抗菌活性的贡献远远低于 SgI 衍生产物。因此，当精液液化后释放出活动的精子离开阴道后，伴随着 SgI 分子的进一步降解，精液的抗菌活性也逐步消失。精液在液化过程中抗菌活性的无—强—弱—无的变化是锌离子依赖的(Edström et al, 2008)。国内外学者近期的工作都未涉及到天然 SgI 以及 SgII 衍生抗菌肽的纯化。2008 年，我们率先从人精液中分离纯化得到了 4 个衍生自 SgI 的抗菌肽，并对 SgI-29 以及 SgI-52 的抗菌活性进行了研究，结果揭示 SgI-29 的抗菌活性大大高于 SgI-52(Zhao et al, 2008a，2008b)。

阳离子抗菌肽与细菌的相互作用中，抗菌肽在中性pH值时所带净正电荷数量具有重要作用，SgI-25 的的C-末端多出的GGK序列是它与SgI-22 的唯一差别，这一差别使SgI-25 的净正电荷数比 SgI-22 多 1，然而活性测试结果表明净正电荷数的增加并没有提高抑菌活性，反而明显抑制了活性，SgI-25 的抗菌活性是所有SgI-29 及其衍生肽当中最低的，说明增加净正电荷数必须兼顾肽段与菌膜相互作用时的结构要求，包括净正电荷数量、分布及对空间结构的影响。SgI-25 的抗菌活性略微低于 SgI-29，从一个侧面反映了SgI-29 分子N-末端的二个氨基酸残基HN以及C-末端的二个氨基酸残基AH对其抗菌活性的影响不大。与SgI-29 相比，SgI-22 是在SgI-29 的基础上去除SgI-29 分子N-末端的二个氨基酸残基HN以及C-末端的 5 个氨基酸残基 GGKAH，尽管SgI-22 的pI值是所有SgI-29 衍生肽中最低的，然而测定的抗菌活性却是所有SgI-29 及其衍生肽当中最高的。值得注意的是，与模板SgI-29 相比，SgI-22 对大肠杆菌*E. coli*的抗菌活性比SgI-29 提高了约 1.5 倍，然而它对绿脓杆菌*P. aeruginosa* 的抗菌活性却提高了约 5.5 倍(表 3)。抗菌活性测定结果结合螺旋轮作图分析，推测SgI-22 的抗菌活性显著增强的主要原因在于：1) SgI-29 分子中$H^{11}G^{25}$的去除暴露了SgI-22 的R^5K^9碱性氨基酸残基，使得 SgI-22 对实验所用细菌的结合能力大大增强，特别是对绿脓杆菌(*P. aeruginosa*); 2) SgI-29 中突入分子疏水性侧面的K^{27}的去除，有助于SgI-22 的疏水表面的形成，使SgI-22 在与细菌外壁结合后，依赖增强的疏水性，比SgI-29 更易作用于细菌质膜。在SgI-22 基础上去掉了N-端的KQE序列形成的SgI-19 对大肠杆菌*E.coli*以及绿脓杆菌*P. aeruginosa*的抗菌活性均降低了 40%左右，推测主要的原因是SgI-22 中K^1的去除引起了SgI-19 的正电荷区域的较大变化，降低了它与细菌外壁的结合能力，从而导致了抗菌活性的降低。进一步去除SgI-19 的GRDHD序列后形成的SgI-14，其抗绿脓杆菌活性比SgI-19 降低了 63.31%，而抗大肠杆菌活性基本相同。值得注意的是，SgI-14 分子中含有较多的组氨酸(H)残基，其在分子中所占的比例为 28.57%。富含组氨酸的抗菌多肽通常以Zn^{2+}依赖的方式作用于微生物(Rydengård et al, 2006)。同时，富含组氨酸的抗菌多肽大多需在酸性环境下才能发挥其最大抗菌效能(Kacprzyk et al, 2007)。因此，结合正常生理条件下精液进入酸性环境的阴道后，精液液化过程中随SgI分子的逐步水解，原本被未水解SgI分子结合的Zn^{2+}亦被逐步释放，造成液化精液中游离Zn^{2+}远远高于人体其他生理液的实际，SgI-29 及其衍生物在Zn^{2+}存在下的酸性环境中所发挥的生物学功能值得进行深入的研究。

本实验以具有抗菌活性的天然人 SGI 衍生肽 SgI-29 为模板，人工合成了不同氨基酸长度的 SgI-14、SgI-19、SgI-22、SgI-25 以及 SgI-29。测定了合成肽的抗菌活性，结合对合成肽的理化性质分析以及螺旋轮结构预测，探讨了 SgI-29 及其衍生物

的结构−功能关系，得到了 SgI-29 及其衍生物中具有最强抗菌活性的 SgI-22。上述工作为下一步进行以人 SgI-22 为基础的抗菌肽的研究打下了良好基础。

参考文献：

Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 95-199.

Bjartell A, Malm J, Moller C, Gunnarsson M, Lundwall A, Lilja H. 1996. Distribution and tissue expression of semenogelin I and II in man as demonstrated by in situ hybridization and immunocytochemistry [J]. *J Androl*, **17**: 17-26.

Bourgeon F, Evrard B, Brillard-Bourdet M, Colleu D, Jegou B, Pineau C. 2004. Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma [J]. *Biol Reprod*, **70**: 768-774.

Ciornei CD, Sigurdardottir T, Schmidtchen A, Bodelsson. 2005. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**: 2845-2850.

Edström AM, Malm J, Frohm B, Martellini JA, Giwercman A, Mörgelin M, Cole AM, Sørensen OE. 2008. The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins [J]. *J Immunol*, **181**: 3413-3421.

Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. 1982. The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix[J]. *Nature*, **299**: 371-374.

Jonsson M, Linse S, Frohm B, Lundwall A, Malm J. 2005. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen [J]. *Biochem J*, **387**: 447-53.

Kacprzyk L, Rydengård V, Mörgelin M, Davoudi M, Pasupuleti M, Malmsten M, Schmidtchen A. 2007. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions[J]. *Biochim Biophys Acta*, **1768**: 2667-2680.

Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides [J]. *Immunol Methods*, **137**: 167-173.

Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. 2004. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense [J]. *J Immunol*, **172**: 3070-3077.

Robert M, Gibbs BF, Jacobson E, Gagnon C. 1997. Characterization of prostate-specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/semenogelin I [J]. *Biochemistry*, **36**: 3811-3819.

Rydengård V, Andersson Nordahl E, Schmidtchen A. 2006. Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*[J]. *FEBS J*, **273**: 2399-2406.

Wang G. 2008. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles [J]. *J Biol Chem*, **283**: 32637-32643.

Wang GS, Li X, Wang Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design[J]. *Nucleic Acids Res*, **37**: D933-D937.

Wang Z, Widgren EE, Sivashanmugam P, O'Rand MG, Richardson RT. 2005. Association of eppin with semenogelin on human spermatozoa [J]. *Biol Reprod*, **72**: 1064-1070.

Zhao H, Lee WH, Shen JH, Li H, Zhang Y. 2008a. Identification of novel semenogelin I-derived antimicrobial peptide from liquefied human seminal plasma[J]. *Peptides*, **29**: 505-511.

Zhao H, Liu XD, Gao ZH, Zhang JH, Li H, Zhang Y, Lee WH, Shen JH. 2008b. Expression of human semenogelin I-52 and antibacterial activity investigation of recombinant peptide [J]. *Zool Res*, **29**(2): 139-144. [赵 晖，刘孝东，高振华，张建华，李 虹，张 云，李文辉, 申吉泓. 2008b. 人精液凝固蛋白 SgI-52 的表达与抗菌活性研究. 动物学研究，**29**(2): 139-144.]